



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07107999 A**(43) Date of publication of application: **25.04.95**

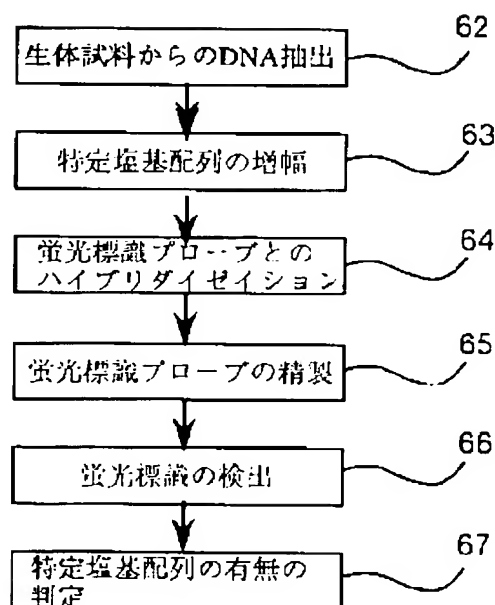
(51) Int. Cl. **C12Q 1/68**
C12M 1/00
C12N 15/09
G01N 21/78

(21) Application number: **05253962**(71) Applicant: **HITACHI LTD**(22) Date of filing: **12.10.93**(72) Inventor: **KIYAMA MASA HARU****(54) METHOD FOR ANALYZING GENE AND APPARATUS THEREFOR****(57) Abstract:**

PURPOSE: To provide a method and apparatus for analyzing a gene in a gene diagnosis technique.

CONSTITUTION: A nucleic acid of an organism or a virus is extracted from a specimen and the nucleic acid is reacted with an oligonucleotide primer having a specific base sequence and labelling a substance having specific mutual action, four kinds of deoxynucleoside triphosphates and a DNA synthetic enzyme to carry out the reaction selectively amplifying the specific base sequence and then, the reaction product is subjected to hybridization reaction with an oligonucleotide probe complementary to the amplified specific base sequence, having a base sequence different from the oligonucleotide primer used in the amplification reaction and labeled with fluorescence and successively, purification of the oligonucleotide probe is carried out using fine particles to which a substance having mutual action to the labeled material of the oligonucleotide primer is bound and the concentration of the fluorescence-labeled substance is detected to detect the existence of the specific base sequence in the specimen.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-107999

(43) 公開日 平成7年(1995)4月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4B		
C 1 2 M 1/00	A			
C 1 2 N 15/09				
G 0 1 N 21/78	C			
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平5-253962

(22) 出願日 平成5年(1993)10月12日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 木山 政晴

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会

社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

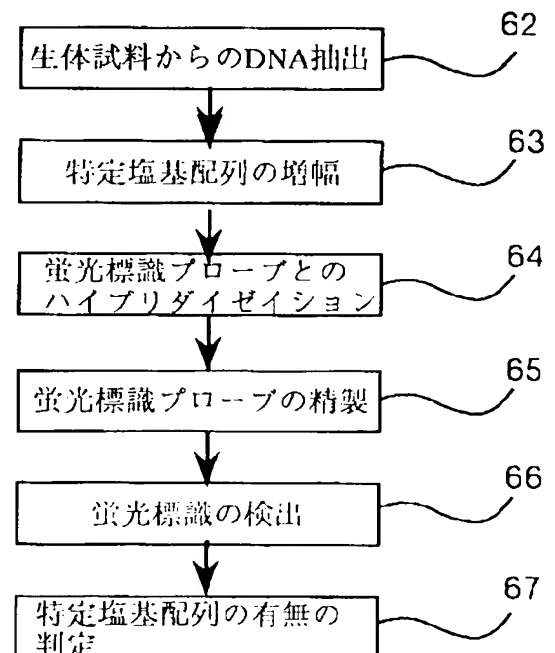
(54) 【発明の名称】 遺伝子解析方法及び装置

(57) 【要約】

【目的】 遺伝子診断技術における遺伝子解析の方法及びその装置に関する。

【構成】 生体試料より生体又はウイルスの核酸を抽出し、これに特定塩基配列を有し、特異的な相互作用を有した物質を標識したオリゴヌクレオチドプライマーと、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、及びDNA合成酵素を作用させて、該特定塩基配列を選択的に増幅させる反応を行い、次いで増幅された該特定塩基配列に相補的で、且つ該増幅反応で用いた該オリゴヌクレオチドプライマーと異なる塩基配列を有し、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプローブと、ハイブリダイゼーション反応させ、次いで該オリゴヌクレオチドプライマーの該標識物と相互作用を有する物質を結合させた微粒子を用いて、該オリゴヌクレオチドプローブの精製を行い、次いで該蛍光標識物の濃度を検出することにより、該生体試料中に該特定塩基配列の存在を検出する。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】生体試料より生体又はウイルスの核酸を抽出し、これに特定塩基配列を有し、特異的な相互作用を有した物質を標識したオリゴヌクレオチドプライマーと、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、及びDNA合成酵素を作用させて、該特定塩基配列を選択的に増幅させる反応を行い、次いで増幅された該特定塩基配列に相補的で、且つ該増幅反応で用いた該オリゴヌクレオチドプライマーと異なる塩基配列を有し、蛍光物質を標識したオリゴヌクレオチドプローブと、ハイブリダイゼーション反応させ、次いで該オリゴヌクレオチドプライマーの該標識と相互作用を有する物質を結合させた微粒子を用いて、未反応の該オリゴヌクレオチドプローブの除去を行い、該蛍光物質または該化学発光物質の濃度を検出することにより、該生体試料中に該特定塩基配列の存在を検出することを特徴とする遺伝子解析方法。

【請求項2】生体試料及び液体を保持する容器と、これに液体を分注、混合、及び除去する分注機と、該容器内の液体を冷却する保冷室と、該容器内の液体を加温する加温機と、上記蛍光標識物を検出する検出器と、該容器を該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器間に搬送する搬送機と、該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器、該搬送機を制御し、且つ該検出器の検出データを解析し、解析結果を判定するコントローラと、該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器、該搬送機の作動空間を覆い、装置内部作業空間と装置外部空間を遮断する筐体を備えたことを特徴とする装置

【請求項3】標識物にビオチンを用い、これと相互作用する物質にストレプトアビジンを用いたことを特徴とする請求項1記載の遺伝子解析方法。

【請求項4】微粒子がポリスチレンビーズであることを特徴とする請求項1記載の遺伝子解析方法。

【請求項5】生体試料を加熱すること特徴とする請求項1記載の遺伝子解析方法。

【請求項6】蛍光標識物の蛍光濃度を基準値と比較することにより、生体試料中の特定塩基配列の存在を検出する判定を行うことを特徴とする請求項1記載の遺伝子解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子診断技術における遺伝子解析の方法及びその装置に関する。

【0002】

【従来の技術】生体試料中の遺伝子を解析することにより、感染症の診断や遺伝子診断が可能となってきた。遺伝子診断を行う上で重要な技術に、特開昭61-274697等を示すPCR (Polymerase Chain Reaction) 法がある。この技術は特定の塩基配列を持つ領域を、この領域のセンス鎖およびアンチセンス鎖の、それぞれ上流の塩基配列を持った核酸断

片をもちいて、DNA合成酵素による鋳型伸長反応を繰り返すことで、10万倍～100万倍に増幅し、試料中にただ1つの標的部位でも選択的に増幅することが出来る。そのため元の試料も、毛髪1本や1滴の血液程度の微量な試料から、ゲノムの特定領域を簡便に増幅できる。このような特徴を持つPCR法は感染症や遺伝病の診断等の臨床検査や、法医学の分野での個人認識等に広く用いられている。

【0003】従来の感染症の遺伝子診断法は、被検者の血液等の生体試料を採取し、PCR増幅を用いて、ウイルスの持つ遺伝子領域が増幅したかしないかを判定している。増幅の有無はこの反応液をアガロースやポリアクリルアミド等のゲルに乗せ電気泳動し、DNAをエチジウムブロミド (E t B r) で染色することにより、既知の遺伝子領域の大きさのDNAバンドがあるか無いかを、目視により判定している。

【0004】また電気泳動を用いなく、PCR増幅された遺伝子を検出する方法に、増幅産物と相補的に結合するオリゴヌクレオチドプローブで相補鎖結合 (ハイブリダイゼーション) をおこなう方法がある。実験医学8巻、9号：(1990)102～106記載の方法は、一本鎖DNAが疎水性表面のプラスチックに吸着することを利用し、増幅された二本鎖DNAを変性して一本鎖DNAに解離して、マイクロプレートに吸着させ、これにビオチン標識したオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーション反応を行い、これにβ-ガラクトシダーゼ標識したストレプトアビジンを加え、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、β-ガラクトシダーゼの蛍光を検出する方法がある。増幅反応を行った反応液に、目的の領域の増幅反応が起こっていない場合、ハイブリダイゼーション反応は起こらないので、蛍光標識物の検出はない。

【0005】尚これらのプロセスは、手操作で行っている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のような検出方法をはじめ、生体試料からゲノムを抽出するプロセス、及びDNA増幅の反応液の調製プロセスはこれまで手操作で行われており、大変な労力を要している。特に多数の試料を手操作で処理するには、過酷であり時には調製ミスを起こす可能性がある。またこれらのプロセスは、液体の注入、混合、分離、加温、冷却等の操作を繰り返す作業であるので煩雑であり、また再現性良く試料調製を行うには熟練を要する。さらに取り扱う生体試料には検査者に感染する恐れのあるウイルスや、環境を汚染する細菌等も含まれる為、組み換えDNA実験指針に示す法律等に従って、作業所全体を隔離したり、クリーンベンチを使用する等、取り扱い場所を限定し厳重な注意を払う必要がある。

【0007】これらの課題を解決するには、生体試料が

らのゲノムの抽出から検出までのプロセスを一貫して行う自動化装置の開発が重要である。プロセスの自動化に関しては、特開平3-125972に示すDNA抽出精製装置があるが、検出手段は設けられていない。従来の検出手段は、前述したとおりであるが、手操作で行うことは簡単でも、そのまま自動化するには課題が多い。電気泳動法を自動化する場合、ゲルを再現性良く作成する工程や、試料をゲルに充填する操作に熟練を要するため、手操作でしか行うことが出来なかった。

【0008】一方電気泳動法独自の課題として、検出時間が長いことが挙げられる。これは電気泳動法での検出には、100ng以上のDNAが必要であり、このためPCR増幅におけるサイクル数を増加させ、PCR産物のコピー数を増加させる必要があった。よってPCR増幅にかかる時間及びゲルの作成から電気泳動でDNAを分離する時間は全部で6時間以上かかる。また電気泳動法では、目的の遺伝子と目的外の遺伝子が共にゲル中での移動度が同じである場合、診断における偽陽性を判断することは困難である。特にPCR増幅法では、オリゴヌクレオチドプライマーの設計や反応緩衝液組成、及び温度サイクルの条件等、増幅条件の如何によって、目的の遺伝子領域でないものも同時に多数増幅し、判断ができなくなる問題があった。

【0009】このような問題を解決するには、増幅したDNAの塩基配列を直接観察することが必要で、ハイブリダイゼーションや塩基配列決定をするなど、対策が必要である。一方、前述したβ-ガラクトシダーゼの蛍光を検出する方法は、電気泳動法を用いないため、上記の問題の解決する一つの発明であり、自動化も可能であるが、目的の増幅したDNAの塩基長により、ハイブリダイゼーションの効率が悪くなることや、吸着の条件を最適化する操作が難しいこと、および定量性にかける問題がある。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記課題を達成するためには、自動化に適したプロセスを構築することが重要であり、本発明者らは鋭意研究の結果、予め標識したオリゴヌクレオチドプライマーとDNA合成酵素を作用させ、分析対象試料中の任意の特定塩基配列を選択的に増幅し、その増幅の有無を該特定塩基配列内に相補的であり、且つ蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプローブを作用させ、その蛍光標識を検出する簡便な方法を見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明のプロセスを図1を用いて説明すると、(1)生体試料より生体又はウイルスの核酸を含むDNAを抽出する工程62と、(2)これに特定塩基配列を有し、特異的な相互作用を有した物質を標識したオリゴヌクレオチドプライマーと、4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、及びDNA合成酵素を作用させて、該特定塩基配列を選択的に増幅させる反応を行う工程63と、(3)該特定塩基配

列に相補的で、且つ該増幅反応で用いた該オリゴヌクレオチドプライマーと異なる塩基配列を有し、蛍光物質を標識したオリゴヌクレオチドプローブとDNA増幅工程の反応物を、ハイブリダイゼーション反応させる工程64と、(4)該オリゴヌクレオチドプライマーの該標識物と相互作用を有する結合物を結合させた微粒子を用いて、該オリゴヌクレオチドプローブの精製を行う工程65と、(5)該蛍光標識物の濃度を検出する工程66と、(6)該蛍光標識物の検出データを記憶し、基準値と比較して該特定塩基配列の有無を判定する工程によって、該生体試料中に該特定塩基配列の存在を検出することを特徴とするものである。

【0011】またこれを実行する本発明の装置は、該生体試料及び液体を保持する容器と、これに液体を分注、混合、及び除去する分注機と、該容器内の液体を冷却する保冷室と、該容器内の液体を加温する加温機と、該蛍光標識物を検出する検出器と、該容器を該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器間に搬送する搬送機と、該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器、該搬送機を制御し、且つ該検出器の検出データを解析し、解析結果を判定するコントローラと、該分注機、該保冷室、該加温機、該検出器、該搬送機の作動空間を覆い、装置内部作業空間と装置外部空間を遮断する筐体を備えたことを特徴とするものである。

【0012】

【作用】以下本発明の作用を詳述する。

【0013】(1) DNA抽出工程

生体試料から核酸を抽出しやすくするため、生体試料の蛋白質を熱変性させ、更に界面活性剤を作用させて変性させる。次いで蛋白質分解酵素を混入後、該酵素作用温度に保持することによって、ゲノムDNAを核内蛋白より単離する。次いで、これらの反応液を加熱し、蛋白質分解酵素を失活させる。本発明における生体試料としては、組織細胞、菌体、培養細胞などが用いられ、新鮮な試料に限らず凍結保存やホルマリン保存されたものも用いられ、特に限定されるものでない。

【0014】一般的な蛋白質の熱変性は、生体試料を適当なバッファに懸濁し、90℃以上に保持することで行われる。界面活性剤として用いられるものには、陰イオン性界面活性剤である、ドデシル硫酸アンモニウム(SDS)や、N-ドデシルサルコシン酸ナトリウム(Sarkosyl)及び、非イオン性界面活性剤である、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(商品名:Triton X-100、及びNondiet P-40)が用いられるが、これらに限定されるものではない。

【0015】(2) DNA増幅工程

本発明の解析方法を以下、図2に基づき説明する。

【0016】DNA配列中の、検出しようとする領域と相補する塩基配列を持つオリゴヌクレオチドプライマー

1を準備する。また逆鎖の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマー2を準備しその5'末端付近に標識物3を標識しておく。これらの塩基長は、20塩基以上35塩基前後迄が望ましいが、少なくとも8塩基以上あればオリゴヌクレオチドプライマーとして使用出来る。

【0017】本発明に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは分析しようとする遺伝子DNAに合わせて、適宜任意調製して使用するものであり、プライマーとして機能しうるものであれば特に限定されるものでなく、又その調製に際しては通常行われているDNA合成機等を用いて行えば良い。本発明の実施例では、標識物3はビオチンを用い、後述の精製処理時に必要な結合体7にストレプトアビジンをもちいて、これらの親和性結合を利用するが、他の結合であつても同様に利用することが出来る。

【0018】DNA増幅工程は、得られたゲノムDNAと、準備したオリゴヌクレオチドプライマー1、2と、dATP、dCTP、dGTP、dTTPの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸と、DNA合成酵素および、DNA合成酵素活性の得られる反応緩衝液を加え、常法に従ってPCR増幅を行う。DNA合成酵素には、サーマス・アクチカスより精製された、Taqポリメラーゼ(Cetus)が用いられるが、これに限定されるものではなく、Tth DNAポリメラーゼ等のDNA合成酵素も使用することが出来る。

【0019】PCR増幅方法を具体的に説明すると、対象のゲノムDNAを90度以上の高温で1本鎖に解離させ(デナチュレーション反応)、次いで相補鎖が結合する温度に保持する(アニール反応)。ついでDNAポリメラーゼの活性温度に保つと、アニール反応時に、オリゴヌクレオチドプライマー1、および2が、ゲノムDNAにアニールしていれば、DNA合成酵素がデオキシヌクレオチド三リン酸を取り込み、鋳型伸長反応を行い(エクステンション)、目的の領域を含む二本鎖DNAが合成される。ついで再びデナチュレーション反応を行い一本鎖に解離させ、それぞれ的一本鎖DNAに、もう一方のオリゴヌクレオチドプライマーとアニール反応が起これば、特定の長さの目的の二本鎖DNA4が得られ、これらの工程を20から30回繰り返すと、目的の二本鎖DNA4が100万コピー以上得られる。

【0020】得られたゲノムDNA中に目的のDNA領域がない場合、目的の塩基長を持つ二本鎖DNA4は産生されない。尚、それぞれのオリゴヌクレオチドプライマー1および2は、数10pmolの等量を加える場合が一般的であるが、オリゴヌクレオチドプライマー1を数pmolの制限量加え、もう一方の標識したオリゴヌクレオチドプライマー2を、オリゴヌクレオチドプライマー1の10から100倍量加え、二本鎖DNAより多くの一本鎖DNAを得る方法もあり、いずれの方法も有効である。

【0021】(3) ハイブリダイゼーション工程

DNA増幅工程を行った反応液に、オリゴヌクレオチドプローブ5を作用させる(ハイブリダイゼーション)。このオリゴヌクレオチドプローブ5の塩基配列は、目的とするDNA配列中の、オリゴヌクレオチドプライマー1および2の配列以外を選択し、更にこのオリゴヌクレオチドプローブ5の5'末端或いは5'末端から数塩基内側の領域に蛍光色素6が標識されたものを準備する。このオリゴヌクレオチドプローブ5の塩基長は、20塩基以上であれば使用可能であり、好ましくは30から50塩基あればより確実であるが、塩基長が長鎖となれば切断されやすくなり、その取り扱いや、合成に手間がかかるため、20から30塩基前後のものが適切である。

【0022】本発明において蛍光色素6は後述の検出器の構成を考慮する必要があるが、良く用いられるものとして、テキサスレッドやフルオレセインイソチオシアネイト(FITC)があり、適当な蛍光が得られる蛍光色素であれば、何等これらに限定されるものではない。ハイブリダイゼーション反応は、二本鎖DNA4を変性させ、一本鎖DNAに解離し、次いで一本鎖DNAとオリゴヌクレオチドプローブ5と相補鎖に結合させる方法である。一般的な変性方法にはアルカリ変性と熱変性があるが、熱変性の方が簡便である。具体的には、PCR増幅反応後の反応液に、オリゴヌクレオチドプローブ5を混合し、反応液温度を90℃~95℃に保ち、次いで反応液温度を40~70℃の温度に保ち、その後4℃に急冷する。尚、反応液の温度は上記の限りでなく、対象となる遺伝子の塩基配列や塩基長により異なるため、最も効率良くハイブリダイゼーション反応が起こるよう各々の温度を調節しなければならない。

【0023】(4) 精製工程

ハイブリダイゼーション工程を行った反応液に、標識物3との結合物7をコートした磁気ビーズ8を混在させ、次いで容器10外より磁気9を作用させる。この過程においてDNA増幅工程で使用した、標識物3であるビオチンが、結合物7であるストレプトアビジンと特異的結合を起こし、磁気ビーズ8に結合し、次いで容器10外からの磁気的作用により磁気ビーズ8は強磁性体となり容器10内に凝集する。この後ピペットを用いて洗浄液を添加後、洗浄液の吸引と排出を繰り返すと、精製工程は終了する。この精製においてDNA増幅工程で用いたオリゴヌクレオチドプライマー2は、DNA増幅工程で目的の二本鎖DNA4の増幅の有無に係らず容器10内に残留する。目的の二本鎖DNA4の増幅産物がある場合、これにハイブリダイゼーション工程で結合した、オリゴヌクレオチドプローブ5が容器内に残留する。結合物7をコートした磁気ビーズに用いられるものとしては、ダイナール社製のダイナビーズM-280ストレプトアビジンがあり、これは粒径2.8μmポリスチレンビーズに、ストレプトアビジンが化学的に結合されている

ものであるが、これに限定されるものではない。

【0024】(5) 検出工程

精製工程を行った反応液に、ハイブリダイゼーション工程で用いた蛍光色素6に、蛍光色素6の励起波長5.4を照射し、発光波長5.5を光電子倍增素子によって検出する。この方法において検出器の構成としては光源4.8、照射部、発光を調整する調整部、発光を受光する受光部を備えている。本発明において蛍光色素6にFITCを用い、その極大励起波長である494nmを、アルゴンレーザを光源4.8として調整して照射し、発光波長518nmをホトダイオードを用いているが、蛍光色素に他の物質を用いても、これらの蛍光色素の励起波長を与える適当な光源があれば、同様に用いることができる。例えば、テキサスレッドを用いるならば、その励起波長594nmをヘリウム-ネオンレーザが使用出来、ローダミンを用いるならば、その励起波長578nmをヘリウム-ネオンレーザ或いはヤグレーザが使用出来る。

【0025】(6) 判定工程

検出器での該蛍光標識物の検出データはCPUに転送され、記憶される。次いで、検出データは目的別に設定された基準値と比較され、特定塩基配列が増幅したかしないかを判定し、表示パネルに表示する。また検出データは増幅したDNAの量に相関があるので、定量的な測定にも使用することが出来る。なお基準値は、目的別の特定塩基配列の濃度に応じた蛍光強度をもとに設定されている。

【0026】次いで、本発明を実行する遺伝子診断装置の作用を説明する。

【0027】この発明にかかる遺伝子診断装置においては、一体成型して作られた容器は多数の独立した孔が設けられており、多数の試料を一度に処理することができ、また分注機が設けられているから、試薬を定量的に概容器に分注することや、混合及び吸引除去が出来るため、DNA抽出工程におけるSDSや蛋白質分解酵素の注入、及びDNA増幅工程におけるオリゴヌクレオチドプライマー1及び2、4種のデオキシヌクレオチド三リン酸、DNA合成酵素、反応緩衝液の添加、及びハイブリダイゼーション工程におけるオリゴヌクレオチドプローブ5、及び精製工程における磁気ビーズ8等の添加、混合、オリゴヌクレオチドプローブ5の吸引除去を行うことが出来る。また保冷室が設けられているから、生体試料及び試薬の保存が出来る。また加温機が設けられているから、容易に容器内の液体を加温することが出来るので、DNA抽出工程における生体試料の加熱、蛋白質分解酵素の作用温度の保持、及びDNA増幅工程における、対象のゲノムDNAを90度以上の高温で1本鎖に解離させる温度、相補鎖が結合する温度、DNA合成酵素を活性させ、デオキシヌクレオチド三リン酸を取り込み鋳型伸長反応が行われる温度、及びハイブリダイゼーション工程における、二本鎖DNAを変性させ、一本鎖

DNAに解離する温度、次いで一本鎖DNAとオリゴヌクレオチドプローブと相補鎖に結合させる温度に容易に保持することが出来る。また検出器が設けられているから、検出工程におけるハイブリダイゼーション工程で用いたオリゴヌクレオチドプローブの標識物である蛍光色素に、蛍光色素の励起波長を照射し、発光波長を光電子倍增素子によって容易に検出することが出来る。また、搬送機によって容器を上記分注機、上記保冷室、上記加温機、上記検出器間に搬送することが出来る。また上記分注機、上記保冷室、上記加温機、上記検出器、上記搬送機の作動空間を覆い、装置内部作業空間と装置外部空間を遮断する筐体が設けられているから、生体試料を閉じ込めた状態で処理することができるので、作業や環境を汚染することなく遺伝子解析を行うことが出来る。

【0028】このように生体試料を解析するために必要な、試薬の分注、混合、遠心分離操作、加温の操作がコントローラによりプログラマブルに実行できるため、試料の調製を自動で行うことが出来る。そして検出器によって、調製された試料の調製結果を得ることが出来る。

20 【0029】

【実施例】遺伝子解析装置の構成を図3に示す。1.2は容器を示し、一つの容器に横8列縦1.2列合計9.6の孔1.3が設けられており、それぞれの孔1.3に調べたい試料1.4を保持し、この孔1.3のそれぞれの中で試料調製が行われる。1.5は分注装置を示し、詳細は後に記載するが、この分注機1.5は、使い捨てのチップ内に液体を保持し、試薬容器から試料容器へ、定量的に液体を注入したり、試料から不要な液体を吸引し除去したり、試料内にチップ先端を保持し、吸引及び吐出を繰り返すことで、液体と試料の混合を行うことが出来る。1.6は加温機を示す。この加温機1.6は、設置された容器1.2内の液体を、任意の温度で任意の時間保持することが出来、連続的に酵素反応及び生化学反応を制御することが出来る。1.7は保冷室であり、容器1.2内の試料及び試薬を保存することが出来る。1.9は検出器であり、容器1.2内の試料の調製結果を調べる機構であり、詳細は後に記載するが、光源、試料への照射部、試料台、検出部からなる。2.0は搬送機を示し、その先端は容器1.2を水平に保持し移動することが出来、容器1.2を分注機1.5、加温機1.6、保冷室1.7、検出器1.9のそれぞれへ搬送することが出来る。2.1はコントローラであり、分注機1.5、加温機1.6、保冷室1.7、検出器1.9、及び搬送機2.0の各機構をプログラマブルに動作させる。またコントローラ2.1は試料調製中の動作を監視し、更に試料調製の結果を取り込み、遺伝子解析の判定を行う。また本装置の分注機1.5、加温機1.6、保冷室1.7、検出器1.9、及び搬送機2.0を覆うよう、筐体6.8が設けられており、試料調製中は試料を装置内に閉じ込める作用がある。

50 【0030】このように試料調製における基本動作であ

る、液体の分注、分離、混合、および液体の保温、保存を行うことができるので、様々な酵素反応や液体の分離が可能であり、以下示すような試料調製を本装置は実行することが出来る。尚、遺伝子解析の対象は本実施例の限りでなく、既知の遺伝子領域であれば、如何なるDNA領域にも対処することが出来る。

【0031】1. 遺伝子抽出方法

本装置に用いる試料は、血液、組織細胞、精液等の生体試料が挙げられる。これらは採取しやすいので遺伝子解析では良く用いられる試料である。血液をそのままの状態に遺伝子診断に用いる場合、白血球細胞や血清中よりDNAを抽出する。血液1μl中に白血球は約5000個含まれ、50μlの血液があれば約1μgのゲノムDNAが得ることができ、ゲノムの診断における点突然変異の検出や、遺伝子多型を調べて個人の識別が可能である。またウイルスの感染の診断の場合、症状が認められるほどの感染後期であれば、1ml以下の血液量で感染菌の同定を診断することが出来る。

【0032】以下、ゲノムDNAの抽出方法を記載する。

【0033】血液からゲノムを抽出する場合を、図3および図4を用いて説明する。容器12の孔13それぞれに、血液50μl分注し、次いでTNEバッファ（10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM EDTA）を100μl分注する。次いで10% SDSを10μl分注し、この際分注機15によって血液とTNEバッファ及びSDSを混合する。次いで加温機16に容器12を設置し、95度で5分加熱する。この操作により血液成分の蛋白質はほぼ変性され、ゲノムは核外へ放出される。この後容器12を分注機15へ移動し、蛋白質分解酵素であるプロテイナーゼK（10mg/ml, SIGMA社製）を5μl分注し混合する。次いで加温機16に容器12を設置し、55度で30分加熱する。この操作により、ゲノムDNAが巻きついたヒストンを分解し、増幅反応が行われ易くする。この反応液を90℃で5分加熱し、この後10μlを増幅反応へ持ち越す。診断対象がmtDNAの場合を説明する。mtDNAは生化学辞典（東京化学同人発行）によると、ミトコンドリアは1細胞当たり100から2000個含まれ、ヒトの場合1000から2000個含まれる。ミトコンドリアDNA（mtDNA）はヒストンと結合されておらず、プラスミド状態である。このため本発明での抽出方法では、ゲノムDNAの抽出とは異なり、95度で5分加熱する熱変性だけで、増幅には十分な量のDNAが得られる。

【0034】診断対象がメッセンジャーRNA（mRNA）の場合を説明する。生体試料中にはリボヌクレアーゼ（RNase）が含まれており、mRNAを分解するので、採取した生体試料は必ずさまフェノールやクロロホルム等の有機溶媒を混合し、遠心分離操作を行い、R

Naaseを分解することが望ましいが、本発明では遠心分離操作を省いている。よってこの場合の遺伝子抽出方法はDNAと同様に行う。この後mRNAは直接PCR増幅を行うことが出来ないの、逆転写酵素により相補的DNA（cDNA）を合成する必要がある。本実施例では既知の領域に相補するプライマーを用い、既知領域のcDNAの合成を行う。cDNAの合成方法を詳述すると、生体試料を前述のゲノムDNAの抽出方法と同様に行い、mRNAを準備する。次いでこれに以下の試薬20μlを混入する。

【0035】1×PCR Buffer

1mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Takara)

20 units RNase インヒビター (Takara)

1μg アンチセンス プライマー

200 unit 逆転写酵素 (リバー ス トランスクリプターゼ XL, Takara) これらの反応液を調製し、37℃で1時間反応を行えばcDNAが得られる。

20

【0036】一方ウイルスゲノムの検出においての抽出方法は、ウイルスゲノムにはDNAウイルスとRNAウイルスがあるが、上記の方法と同様である。この場合、ウイルス感染初期では、ウイルスの数はごくわずかであるため、通常のPCR増幅では、検出できる感度まで増幅できない恐れがある。この場合、用いる生体試料の量を増加させるか、PCR増幅の温度サイクル数を増やしたり、増幅率を向上させる必要がある。本発明では容器の容量に制限があるため、生体試料の量をmlオーダーに増加させることはできないが、一度の処理を大量に行なえるため、同一試料からのスクリーニング回数を増やすことによって、感度を向上させることが出来る。

30

【0037】2. 遺伝子増幅方法及び検出方法

1. によって得られた遺伝子をPCR増幅法を用いて各目的の領域を増幅し、検出を行った。

【0038】(1) ヒトゲノムの点変異検出の例

ヒトのフェニルケトン尿症の遺伝子解析による診断例に、実験医学、8巻、9号：(1990)135頁～139頁がある。これによるとフェニルケトン尿症は、点変異による遺伝子異常によりアミノ酸置換がおり、臨床的には知能低下やけいれんが認められ、現在は新生児マススクリーニングの対象となっている。我々は、この報告をもとに、既知の塩基配列に遺伝子異常があるか無いかを、この遺伝子領域の増幅の有無により調べる方法に、本発明を用いた。まず計96人分のフェニルケトン尿症患者の血液と、正常人の血液を入手し、1.の方法に従って、DNAを1μg抽出した。フェニルケトン尿症患者に特異な遺伝子領域であるエクソン12は点変異によって、正常はArg (CGG)であるのに対し、異常ではTrp (TGG)になっている。プライマの設計

50

は、この変異部位のCが、オリゴヌクレオチドプライマーの3' 端にマッチするプライマ1と、逆鎖のプライマ2をDNA合成機(ABI 390A)により合成した。このプライマ1と2がマッチする場合、PCR増幅は行われ、245bpの塩基長の二本鎖DNAが得られる。これと同様に、確認のためプライマ1が異常がある場合マッチするオリゴヌクレオチドプライマ(プライマ1')を合成した。それぞれのオリゴヌクレオチドプライマーの配列を以下に示す。

【0039】プライマ1 5'-ATGCCACTG
AGAACTCTCTC-3'

プライマ1' 5'-ATGCCACTGAGAACT
CTCTT-3'

プライマ2 5'-AGTCTTCGATTACTG
AGAAA-3'

これらのオリゴヌクレオチドプライマーのうち、プライマ1、およびプライマ1'を、ヌクレイックアシッドリサーチ(Nucleic Acids Research), 13巻:1529-1541の方法に従ってピオチンを標識したものを準備した。次いでPCR増幅を以下の組成で行った。

【0040】10mM Tris-HCl, pH8.0
(mark)

50mM KCl (和光純薬)

1.5mM MgCl₂ (和光純薬)

0.1% ゼラチン (sigma)

10pmol プライマ1

10pmol プライマ2

0.25mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
(Takara)

2.5unit DNA合成酵素 Taq polymerase
(Cetus)

この反応液100μlを、加温機にて以下のように加温した。

【0041】95℃×1分

(95℃×1.5分、55℃×1分、72℃×2分) ×
28サイクル

この後確認のため操作を中断して、DNA増幅工程を終えた4試料について、2%アガロースゲル(Takara)にて電気泳動を行った。これをEtBrで染色し、UVランプを用いて紫外線を照射し発光を観察した。結果を図5に示す。22はサイズマーカーであり、プラスミドφX174を制限酵素HaeIIIで消化したものである。目的の増幅産物は、サイズマーカー22の上方から8番目のDNAと、ほぼ同じ移動距離の位置に現れる。23はプライマ1とプライマ2を用い、24はプライマ1'とプライマ2を用いて、DNA増幅工程を行ったものである。23の4試料のうち、No. 2とNo. 3は増幅DNAが現れ、No. 1とNo. 4からは、発光はみられなかった。一方24の場合、No. 1とNo. 4

からは発光がみられたが、No. 2とNo. 3からは発光がみられない。No. 1の増幅産物量をサイズマーカーより換算すると、約2pmolであった。

【0042】この反応液を4℃に保存した。次いでプライマ1及びプライマ1'側の配列に相補的な配列を持った、ハイブリダイゼーションプローブ(プローブ1)を混合する。プローブ1の塩基配列を示す。

【0043】プローブ1 5'-ATTACTTACT
GTTAATG-3'

10 このプローブ1の5'末端には、蛍光色素をアナリティカルケミストリ、62号、900(1990)記載の方法に従ってFITCを付加している。次いでPCR反応液にプローブ1を1pmol混入し、ハイブリダイゼーション工程を行った。ハイブリダイゼーション工程は、PCR反応液50μlに対し、準備した0.1pmol/μlハイブリダイゼーションプローブ10μlを混合し、これらを95℃に3分間加温し、次いで37℃で10分間加温し、次いで4℃に加温した。次いで精製工程を行った。精製工程は、ハイブリダイゼーション反応液60μlに、精製洗浄液100μl(10μg磁気ビーズM-280ストレプトアビジン(ダイナル))を分注機で注入、混合後、10分間室温で保持し、次いで分注機の容器保持台に内蔵された磁石を作用させ、ピオチン標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを凝集した。次いで分注機を動作させ、混合後反応液全量を吸引した。次いで、TEバッファ(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)50μlを混合し、容器内の核酸を懸濁し、次いで、検出器に容器を搬送し、FITCの発光(518nm)を測定した。

30 【0044】検出結果を図6に示す。このうちフェニルケトン尿症患者から抽出した試料1及び4は、非患者である試料2及び3の蛍光度よりも高い蛍光強度を示した。これ以前にFITC標識したオリゴヌクレオチドプローブを1pmol測定した結果、蛍光強度は約10,000(相対値)を示し、これに精製工程を行うと約100(相対値)を示したので、解析結果の判定基準値を1,000(相対値)とし、検出データが基準値以上は目的の塩基配列の増幅が行われているとし陽性を示し、基準値以下は目的の塩基配列の増幅が行われていないが、目的の塩基配列が少ないので、陰性を示すようプログラムした。よって図6中の判定項目は、No. 1及びNo. 4は陽性である+を示し、No. 2, No. 3は陰性である-を示している。同様に他の試料についても判定することが出来た。

40 【0045】(2)ウイルス感染症のウイルスゲノムの検出の例

ヒトB型肝炎ウイルス(Hepatitis B Virus: HBV)感染による肝炎の、遺伝子検出方法に関する文献に蛋白質 核酸 酵素, 35巻, 17号:

50 (1990), 3003頁~3010頁がある。これに

よると、HBVゲノムは約3,200塩基対の2本鎖DNAであり、既に全塩基配列が決定されている。我々は上記の報告に従って、本発明を用いて以下の方法によりHBVゲノムの検出を行った。HBVはDNAウイルスであるので、生体試料からの遺伝子抽出は1.の方法に従って100 μ lの血液より抽出したDNAを約0.5 μ g用いた。PCR増幅により増幅させる遺伝子領域は、HBs抗原中の遺伝子の432bpであり、この領域の遺伝子部位は変異が少なく、良く保存されている領域である。この領域の両端にそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチドプライマー（プライマ3とプライマ4）をDNA合成機により合成した。プライマの配列を以下に示す。

【0046】プライマ3 5'-GGACTTCTCTCAATTTTCTAGGG-3'

プライマ4 5'-CAAATGGCACTAGTAAACTGAGC-3'

次いで前記の方法に従って、プライマ3及びプライマ4をビオチンを標識した。

PCR反応液の組成は50 μ l中

10mM Tris-HCl (mark)

50mM KCl (和光純薬)

1. 5mM MgCl₂ (和光純薬)

0.1% ゼラチン (sigma)

50pmol プライマ3

5pmol プライマ4

0.25mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Takara)

2. 5unit Taq polymerase (Cetus)

この反応液を、加温機にて以下の条件で加温した。

【0047】95℃×1分、(95℃×1.5分、57℃×1分、72℃×2分)×40サイクル

この反応液を4℃に保存した。次いでプライマ3とプライマ4に挟まれた領域のハイブリダイゼーションプローブ（プローブ2）を混入した。プローブ2の塩基配列を示す。

【0048】プローブ2 -TCCTCTTCATCC TGCTGCTATGCCTCATCT-3'

このプローブ2の5'にFITCを付加したものを準備した。保存したPCR反応液にプローブ2を5pmol混入し、ハイブリダイゼーション工程を行った。ハイブリダイゼーション工程の手順を以下に示す。

【0049】PCR反応液50 μ l

1pmol/10 μ l プローブ2

これらを95℃に3分間保温し、次いで37℃で10分間保温し、次いで4℃に保温した。次いで精製工程を次の手順で行った。

【0050】ハイブリダイゼーション済反応液 60 μ l

精製洗浄液100 μ l (10 μ g 磁気ビーズ M-280 ストレプトアビジン (ダイナル))

以上を分注機で注入、混合後、10分間室温で保持し、次いで分注機の容器保持台に内蔵された磁石を作用させ、ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを凝集した。次いで分注機を動作させ、混合後反応液全量を吸引した。ついで、TEバッファに溶解し、検出器にて検出を行った。検出器に容器1を搬送し、オリゴヌクレオチドプローブに標識したFITCの蛍光光518nmの蛍光強度を測定した。

【0051】検出結果を図7に示す。このうち肝炎患者から抽出した試料1及び3は、非患者である試料2及び4の蛍光度よりも高い値を示した。(1)の検出結果の判定方法と同様に、このプロセスの判定基準値を測定により求め、1,000を基準値とし、プログラムした。よって図7中の判定項目に、試料No. 1、No. 3は陽性を示し、No. 2、No. 4は陰性を示し、同様に他の試料についても判定することが出来た。

【0052】3. 装置の説明

20 本発明における装置の詳細を以下記載する。

【0053】図3は本発明における全体概略図を示し、図8は分注機、図9は加温器、図10は保冷室、図11は検出器の概略と構成を示す。

【0054】分注機15の詳細な機構を図8を用いて説明する。12は容器を示し、前述の様に96穴の孔13が設けられ、これらの孔13内で生体試料を保持、加温、試薬の注入、混合等が行われる。同様に18は同じ容器を用いて試薬等を保持する試薬容器であり、容器12は試料台30に、試薬容器18は試薬台31上に保持される。尚試料台30内部には、磁気ビーズの励磁のために、磁石を内蔵してあり任意に試料に対して磁力を作用させることが出来る。次いで32は、液体を直接保持するチップ33を格納するチップラックであり、チップ台34上に保持され、容器台30、試薬容器台31、チップ台34は同一の移動プレート35上に構成され、この移動プレート35はモータ36の駆動によって、図中矢印37の方向に移動できる。分注動作は次の様に行われる。前述のチップ33はノズル38に、はめあい可能に取り付けられる。ノズル38は容器12の孔13の間隔、及びチップラック32上の、チップ33の並んだ間隔にあわせて8本設けられており、1度の分注動作で、8つの試料に分注可能である。このノズル38へチップ33の取付け方法は、移動プレート35を移動し、原点位置にあるノズル38の下方にチップ33を位置させ、ノズル38の位置を、図中矢印39の下方方向に、移動モータ40の動作によって移動し、ノズル38をチップ33へ押しつけて取り付けられる。次いでチップ33が取り付けられた状態で、ノズル38を原点位置に戻し、移動プレート35を駆動し、ノズル38の下方に試薬の入った孔13を位置させ、ノズル38を下方に移動させ、

チップ33の先端を試薬の液中に浸漬させる。この状態で、ノズル38の内孔に内包されたピストン41を、ピストンモータ42の駆動によって、図中矢印43の上方方向に移動させると、試薬がチップ33内に吸引保持される。次いで、試薬を試料に分注する動作は、試薬をチップ33内に吸引保持したまま、ノズル38を原点位置に戻し移動プレート35を移動し、ノズル38の下方に孔13を位置させ、次いでノズル38を下方に移動させ、チップ33の先端を容器12内の試料に浸漬させる。この状態でピストン41を、試薬を吸引したときの逆の方向に駆動し、試薬をチップ33より吐出させる。この時試薬と試料を混合させたい場合は、この状態でピストンモータ42を試薬を吸引する場合の方向と、試薬を吐出する場合の方向とに順番に駆動することで可能となる。ノズル38に取り付けられたチップ33の取外しは、ノズル38を原点位置に戻し、移動プレート35を移動して、これに設けられたチップ廃棄口44をノズル38の下方に位置させ、ピストンモータ42と連動して駆動するチップ外し部(図示せず)によって取り外される。

【0055】次いで加温機の詳細な機構を図9を用いて説明する。12は容器を示し、46は伝熱ブロックであり、容器12の裏側形状に合うよう加工されている。伝熱ブロック46はその内部のヒータと冷却ブロックの切り替えにより、温度を120度から0度にまで、任意の時間保持することができる。このように容器12を伝熱ブロック46上に設置し、伝熱ブロック46の温度を任意の温度に保てば、容器1内の試料の温度を変化させることができる。

【0056】次いで保冷室の詳細な機構を図10を用いて説明する。12は容器を示し、47は冷却ブロックであり、容器12の裏側形状に合うよう加工されている。冷却ブロック47は恒に4℃に保たれており、生体試料や試薬を長時間保存することができる。

【0057】次いで検出器19の詳細な機構を図11を用いて説明する。図11(a)は検出器19の透視外観図であり、図11(b)は検出器19の蛍光検出方法を更に具体的に示した構成図である。

【0058】図11(a)において48は光源であるレーザ、49はレーザ電源、50は試料に励起光を照射する照射部及び蛍光光を受光する受光部で構成された検出部、51は容器12を保持する搬送プレート、52は搬送プレートを移動するパルスモータであり、搬送プレート51とパルスモータ52はゴムベルト56で連結されており、搬送プレート51は搬送ガイド76上を矢印方向に移動させ、試料を検出位置に移動させる。この移動制御はパルスモータ52を制御する計算機21の指令に従っており、またこの計算機21は検出部50で検出されたデータを取り込み、検出結果を判定する。75は外装であり、上記検出部50、容器12、搬送プレート51を覆い、検出部環境を暗室状態に保持することが出来

る。

【0059】図11(b)を用いて検出方法を説明する。レーザ48より発したレーザ光(励起光)54はミラー57を経て、照射部58に到達する。照射部58内は光ファイバチューブ59、焦点レンズ72により構成され、励起光54を透過収束させる。励起光54はハーフミラー73を透過し、容器12の孔13内試料に照射される。試料中の蛍光色素量に応じて、蛍光色素が励起され蛍光光55を発する。蛍光光55はハーフミラー73を反射し、干渉フィルタ69を透過しフォトダイオード70に到達する。フォトダイオード70により検出された蛍光光55はその強度により電気信号として、図11(a)のコントローラ21に送られ判定される。

【0060】本実施例において使用する蛍光色素に、FITCを用い、レーザ48にはアルゴンレーザを用い、干渉フィルタ69には500nmを用いているが、これらに限定するものでなく蛍光色素にテキサスレッド、或はローダミン系色素などを用いても、適当な励起光を発する光源、及び励起光と蛍光光を干渉する干渉フィルタとの組合せにより実行可能である。また本実施例では照射部58は光ファイバチューブ59を用いて、容器12の孔13の間隔ごとに8方向に分岐した(図示せず)ことにより、一回の検出時に容器12の1列(8試料)を同時に検出するよう構成したが、他の方法であっても実行できることは言うまでもない。励起光を分岐せず1系統で行なう場合、照射機構及び受光機構が各試料上を移動する方法や、或は照射機構及び受光機構を固定して搬送プレートを2軸制御し検出点に対して試料を移動する方法もあり、本実施例と同様な作用を得られる。また試料を保持する容器は光透過性の材質を用いれば、下方から検出を行なう方法によって実施可能である。

【0061】次いで検出のプロセスを説明すると、ハイブリダイゼーション工程を終えた試料は、容器12の孔13内に保持され、容器12は搬送機20(後述)により搬送プレート51上に設置される。搬送プレート51は、容器12を照射部50の下方に搬送し、1列8試料の蛍光強度の検出を同時に行なう。容器は12列あるので、次の列の試料を測定するには、搬送プレート51を、容器12の孔の間隔分移動させたのち同様に検出する。

【0062】次いで搬送機20の詳細な構成を、図12を用いて説明する。本搬送機はモータ71、モータ間のアーム60、ハンド部61からなる自動制御機械であり、自動組立てライン等で用いられるごく一般的なロボットアームである。この先端に設けられたハンド部73はチャック部74を介して容器12を保持し、持ち上げ、移動後、容器を置くことが出来る。これらはコントローラ21に指令により動作し、容器12を分注機15、加温機16、保冷室17、検出器19のそれぞれの間を最短距離でそれぞれへ搬送することが出来る。

【0063】

【発明の効果】本発明は以上説明したように構成されているので、以下に記載されるような効果を奏する。

【0064】従来方法の検出手段であった電気泳動法では、5時間を要していた。本発明では、液中で蛍光色素を発光させるため、ゲルが不要であるので、ゲルを作成する手間が省け、更に検出においては、96サンプルの試料の検出を、数分の時間で終わるので、実時間は検出前処理から検出まで約1時間であり、時間的な短縮が大きく図れる。また電気泳動法で使用するE t B rは、人体に有害な物質であるが、本発明では用いないため安全である。また本発明では、増幅産物にハイブリダイズした蛍光色素の発光を検出するので、高感度な検出を行うことができる。このため検出時における、目的のDNA領域のコピー数が少なくできるので、PCR増幅の温度サイクル数を、従来方法より少なくでき、時間の短縮が図れる。また電気泳動法では、目的のDNA領域と目的外のDNA領域が同時に増幅し、判断ができなくなることが多く、増幅条件を厳密に検討する必要があったが、本発明では目的外のDNA領域が増幅しても、検出結果には影響が無い。よって一般的な反応条件を実行すれば、安定した検出できるので、厳密な増幅条件を検討する必要が無く、簡便に遺伝子解析を行なうことができる。

【0065】一方本発明における遺伝子解析法を実行する装置を用いれば、作業者は試料調製の大変な作業から逃れることができ、また生体試料には検査者に感染する恐れのあるウイルスや、環境を汚染する細菌等も含まれるが、これらを安全に取り扱うことができる。

【0066】以上の様に、本発明は特に臨床検査における遺伝子解析手法を提供するものであり、医師や検査を *

* 専門に行う機関等が、遺伝病の診断や感染症の診断を簡便に行うことができ、且つ、大量サンプルの処理を可能とし、迅速に遺伝子診断を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例である遺伝子解析方法を示すフロー図。

【図2】本発明の実施例である遺伝子解析方法を示す図。

【図3】本発明の実施例である遺伝子解析装置の概略図。

【図4】本発明の実施例であるDNA抽出方法を示す実施例。

【図5】本発明の実施例であるDNA増幅工程の結果を示す図。

【図6】本発明の実施例であるフェニルケトン尿症の解析結果を示す図。

【図7】本発明の実施例であるHBV遺伝子領域の解析結果を示す図。

【図8】本発明の実施例である分注機を示す構成図。

【図9】本発明の実施例である加熱器を示す構成図。

【図10】本発明の実施例である保冷室を示す構成図。

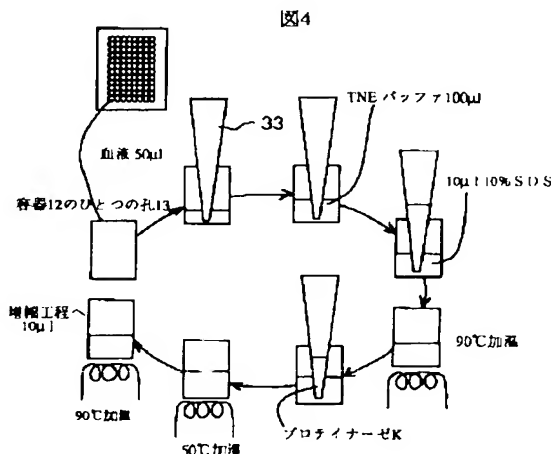
【図11】本発明の実施例である検出器を示す構成図であり、(a)は検出器の透視外観図、(b)は検出器の蛍光検出方法を更に具体的に示した構成図。

【図12】本発明の実施例である搬送機を示す構成図。

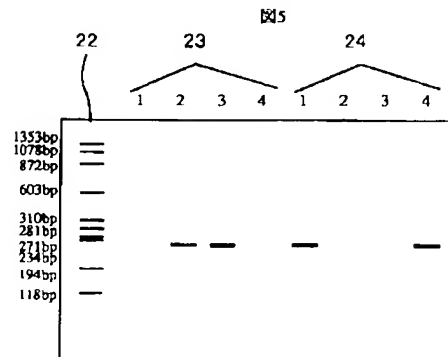
【符号の説明】

1：オリゴヌクレオチドプライマー、2：標識オリゴヌクレオチドプライマー、3：標識物、4：二本鎖DNA、5：オリゴヌクレオチドプローブ、6：蛍光標識物、7：結合物、8：磁気ビーズ、9：磁気、13：容器、48：光源、54：励起光、55：蛍光光

【図4】



【図5】



【図7】

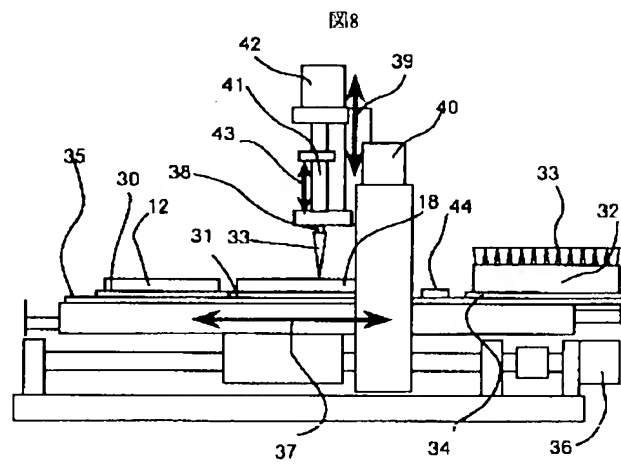
図7

番号	試料	症状	蛍光度	判定
1	T.S	+	15020	+
2	K.K	—	408	—
3	T.K	+	28023	+
4	F.M	—	125	—
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
96	K.Y	—	320	—

— 陰性
+ 陽性

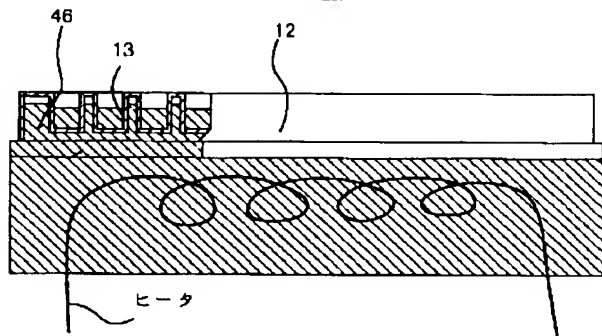
【図8】

図8



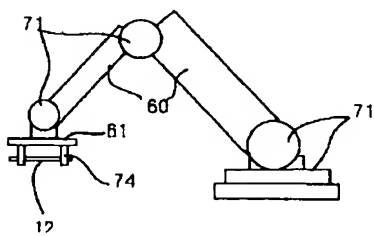
【図9】

図9



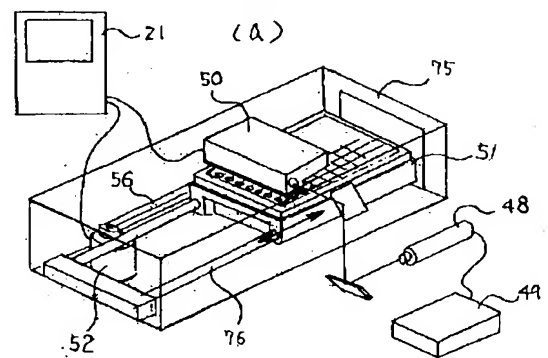
【図12】

図12



【図11】

図11



(b)

